



УДК 547.963.32.07:577.152.314

ПРИМЕНЕНИЕ НУКЛЕАЗ ДЛЯ СИНТЕЗА
2'-5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТОВ И ИХ АНАЛОГОВКарнейский М. Я., Мамаева О. К., Михайлов С. Н.,
Шадукова Н. Ш., Яковлев Г. И.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Смрт И.

Институт органической химии и биохимии ЧСАН, Прага, ЧССР

Полимеризация аденозин-2'(3')-фосфата в присутствии дифенилхлорфосфата приводит к олигомеру, содержащему межнуклеотидные 2'-5'- и 3'-5'-связи. Гидролиз такого олигомера нуклеазами позволяет получить следующие 2'-5'-олигоаденилаты: АрА, АрАрА, АрАрАрА, рАрА и рАрАрА. Для характеристики исходного олигомера и продуктов его ферментативного гидролиза использована ^{31}P -ЯМР-спектроскопия. Конденсация аденозин-2',3'-циклофосфата с (2'-5')АрА в присутствии неспецифической нуклеазы *Penicillium brevicompactum* приводит к аденилил(3'-5')аденилил(2'-5')аденозину. Периодатным окислением (2'-5')АрА и (2'-5')АрАрА с последующим восстановлением NaBH_4 синтезируют аналоги 2'-5'-олигоаденилатов.

В 1978 г. Керром и Брауном был выделен из клеток, обработанных интерфероном, и охарактеризован низкомолекулярный ингибитор белкового синтеза 5'-трифосфориаденилил(2'-5')аденилил(2'-5')аденозин [1], который является активатором специфической эндонуклеазы — фермента, гидролизующего мРНК [2, 3]. Это соединение — первый представитель нового класса природных олигонуклеотидов с 2'-5'-межнуклеотидными связями.

К настоящему времени опубликованы различные схемы синтеза 2'-5'-олигоаденилатов и их аналогов, включающие в себя как чисто химические (см. ссылки в работе [4]), так и ферментативные подходы [5–7].

Цель данной работы — дальнейшая разработка простых методов синтеза 2'-5'-олигоаденилатов и их аналогов. Удобным способом получения таких соединений является ферментативный гидролиз олигонуклеотидов, содержащих как 2'-5'-, так и 3'-5'-межнуклеотидные связи, нуклеазами, гидролизующими только 3'-5'-межнуклеотидные связи. Полимеризация три-*n*-октиламмониевой соли аденозин-2'(3')-фосфата (I) в диоксане в присутствии дифенилхлорфосфата по методу Михельсона [8] приводит к смеси олигомеров (II) с межнуклеотидными 2'-5'- и 3'-5'-связями.

Для характеристики исходного олигомера (II) и продуктов его ферментативного гидролиза была применена ^{31}P -ЯМР-спектроскопия. На рис. 1 представлен ^{31}P -ЯМР-спектр олигомера (II). Группа сигналов (A) относится к концевому циклофосфату олигомеров, мультиплет (B) — к сигналам 2'-5'- и 3'-5'-межнуклеотидных фосфатных остатков [9]. Интегрирование мультиплетных сигналов (A) и (B) дает соотношение концевого циклофосфата к межнуклеотидным фосфатным остаткам (1 : 12), по которому можно оценить среднюю длину олигомера (II): ~13 нуклеотидных звеньев ($n=12$).

На рис. 2 приведен ^{31}P -ЯМР-спектр олигомера (II) после инкубации олигомера с неспецифической нуклеазой *Penicillium brevicompactum*. Группа сигналов (A) отсутствует в спектре вследствие ферментативного гидролиза всех концевых циклофосфатов до 3'-фосфатов. Кроме того, происходит расщепление всех межнуклеотидных 3'-5'-связей в олигомере с образованием соответствующих 3'-фосфатов. Поэтому в спектре наблюдается измененная по форме и интенсивности группа сигналов 2'-5'-фосфатных

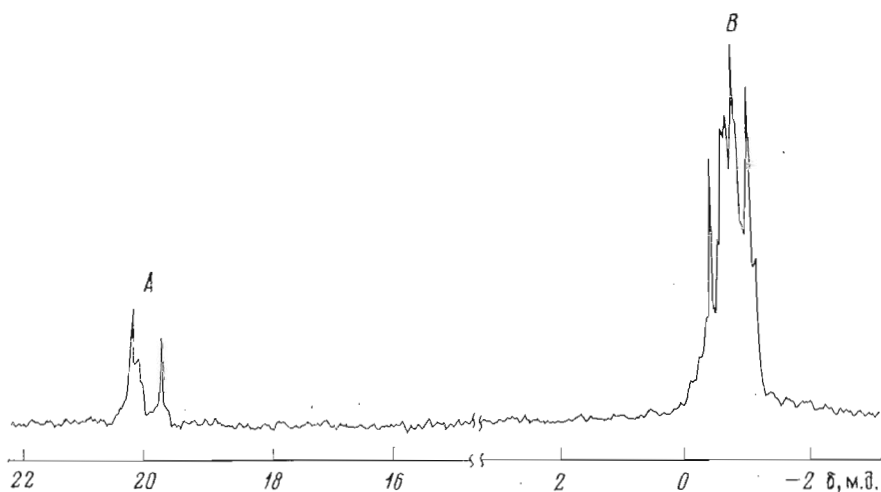


Рис. 1. ^{31}P -ЯМР-спектр олигомера (II) в D_2O , pH 4,8

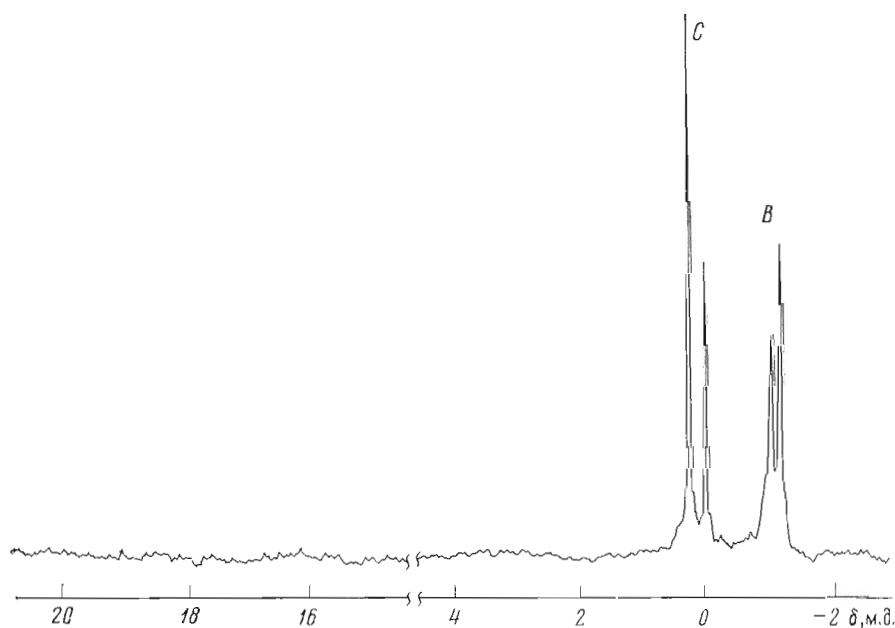
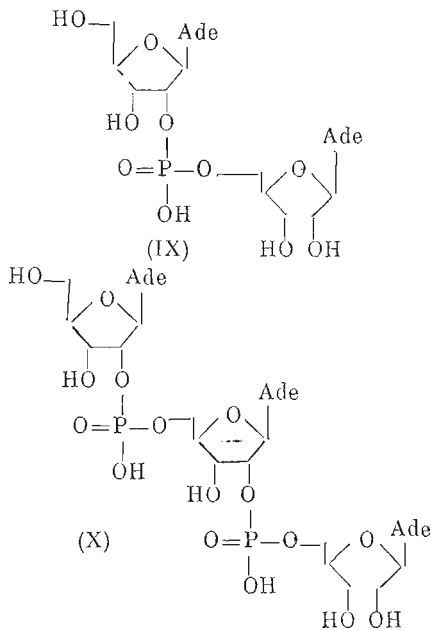
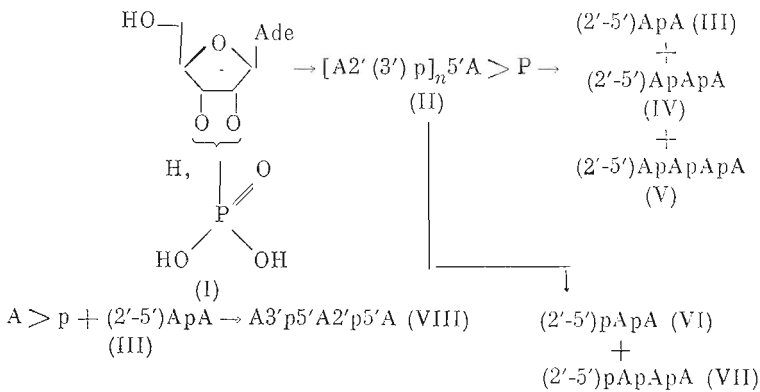


Рис. 2. ^{31}P -ЯМР-спектр продуктов гидролиза олигомера (II) неспецифической рибонуклеазой *P. brevicompactum*, pH 4,8

остатков (B) и в области 0 м.д. появляется группа сигналов (C), относящихся к 3'-концевым фосфатным остаткам. Интегрирование сигналов (C) и (B) с учетом вклада в группу (C) 3'-фосфатных остатков, полученных в результате гидролиза концевых циклофосфатов, дает возможность оценить соотношение 2'-5'- и 3'-5'-межнуклеотидных связей в исходном олигомере (II). Соотношение интенсивностей сигналов (C) : (B) составляет 1,12 : 1. Это означает, что в исходном олигомере (II) содержится 51% 2'-5'- и 49% 3'-5'-межнуклеотидных связей.

На рис. 3 представлен ^{31}P -ЯМР-спектр олигомера (II) после гидролиза нуклеазой *P. brevicompactum* и обработки щелочной фосфатазой *E. coli*. Вследствие гидролиза концевых фосфатных остатков фосфатазой с образованием ортофосфорной кислоты в ЯМР-спектре наблюдается исчезновение группы сигналов (C) и появление синглетного сигнала в области 3 м.д., характерного для фосфорной кислоты при pH 9 и неизменная по форме (ср. рис. 2) группа сигналов (B).

Для получения 5'-фосфорных эфиров 2'-5'-олигоаденилатов исходный олигомер (II) последовательно инкубировался с нуклеазой S₁ *Aspergillus oryzae*, которая гидролизует 3'-5'-олигонуклеотиды с образованием 5'-фосфорных эфиров нуклеозидов [10], и неспецифической рибонуклеазой *P. brevicompactum*.



На рис. 4 приведен ³¹P-ЯМР-спектр олигомера (II) после инкубирования последнего с нуклеазой S₁ *A. oryzae*. Три мультиплетные группы сигналов (A), (B) и (C) соответственно относятся к 2',3'-циклофосфатным, 2'-5'-межнуклеотидным и 5'-фосфатным остаткам. Удаление циклофосфатных групп из 2'-5'-олигоаденилатов было осуществлено добавлением к смеси нуклеазы *P. brevicompactum*, которая гидролизует циклофосфаты до 3'-фосфатов. pH-Оптимумы работы обоих ферментов совпадают, и нуклеаза S₁ *A. oryzae*, обладающая 3'-нуклеотидазной активностью [10], завершает процесс дефосфорилирования 2',3'-циклофосфатов без затрагивания 5'-фосфатных остатков. Таким образом, в спектре ЯМР олигомера (II) после гидролиза нуклеазой S₁ *A. oryzae* и рибонуклеазой *P. brevicompactum* (рис. 5) присутствуют группа сигналов (B) 2'-5'-межнуклеотидных фосфатных остатков в области -1 м.д., мультиплетный сигнал в области 0 м.д. (C), характерный для 5'-фосфатных остатков, и синглет (D) фосфорной кислоты, расположенный в области 0,5 м.д. при pH 4,8.

Использование комбинации двух ферментов, гидролизующих 2'-3'-циклофосфатные группы, приводит к увеличению выхода целевых 5'-фосфорилированных 2'-5'-олигоаденилатов по сравнению с описанным ранее

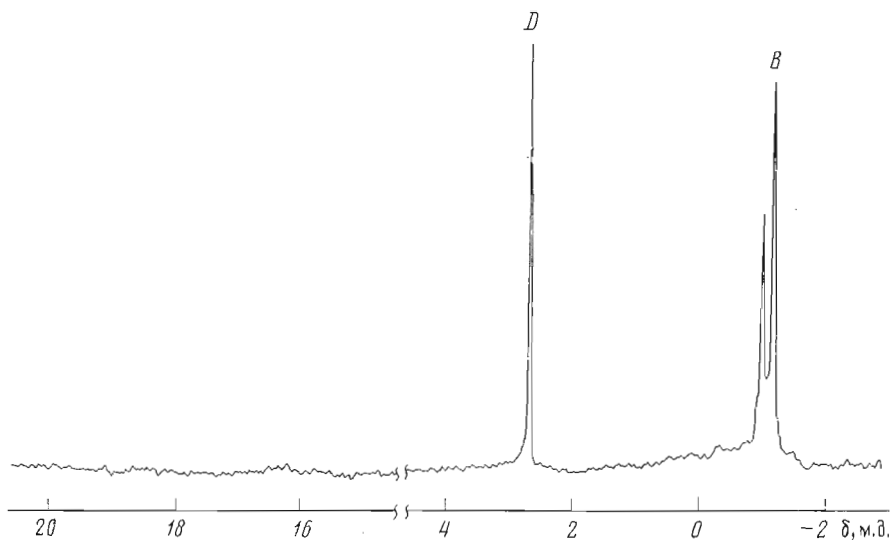


Рис. 3. ^{31}P -ЯМР-спектр продуктов последовательного гидролиза олигомера (II) рибонуклеазой *P. brevicompactum* и щелочной фосфатазой *E. coli* при pH 9

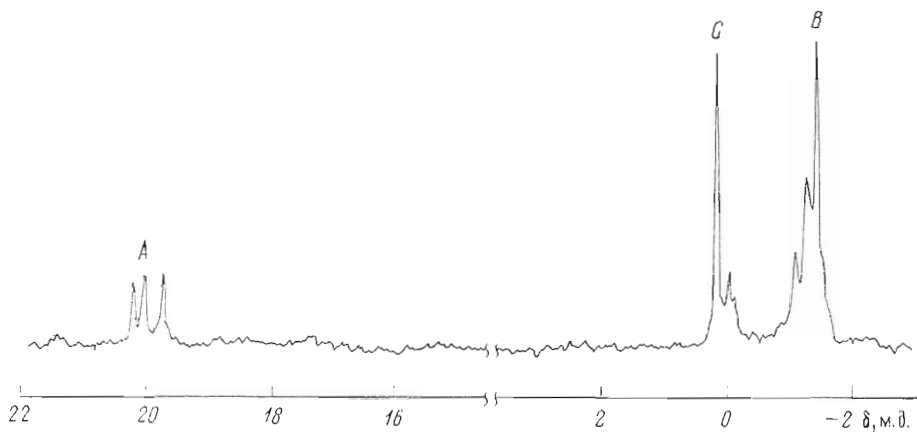


Рис. 4. ^{31}P -ЯМР-спектр продуктов гидролиза олигомера (II) нуклеазой S_1 , pH 4,8

[6] ферментативным гидролизом олигомера (II) рибонуклеазой P_1 , аналогом нуклеазы S_1 .

Препаративное получение 2'-5'-олигоаденилатов было осуществлено по модифицированному методу, предложенному Керром с сотр. [5]. Обработка олигомера (II) неспецифической рибонуклеазой *P. brevicompactum* для гидролиза межнуклеотидных 3'-5'-связей с последующим отщеплением концевых фосфатных групп щелочной фосфатазой *E. coli* приводит к смеси 2'-5'-олигоаденилатов, разделенной хроматографией на DEAE-целлюлозе. Структура полученных (2'-5')ApA (III), (2'-5')ApApA (IV) и (2'-5')ApApApA (V) подтверждена сравнением данных УФ- и ЯМР-спектров с литературными [5, 11-13], щелочным гидролизом олигонуклеотидов (III)-(V) до аденозин-2'(3')-фосфата и аденозина в корректном соотношении, а также устойчивостью этих соединений к действию нуклеазы *P. brevicompactum* и нуклеазы S_1 .

При инкубировании олигомера (II) с нуклеазой S_1 *A. oryzae* и неспецифической рибонуклеазой *P. brevicompactum* в препаративных количествах с последующим разделением продуктов реакции хроматографией на сефадексе G-25 и DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NH_4HCO_3 были получены (2'-5')pApA (VI) с выходом 16% и (2'-5')pApApA (VII) с выходом 5%. Структура синтезированных соединений доказана с по-

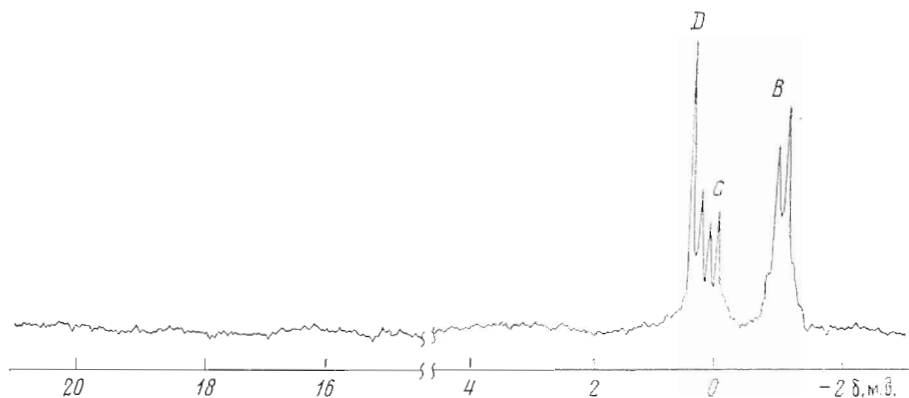


Рис. 5. ^{31}P -ЯМР-спектр продуктов последовательного гидролиза олигомера (II) нуклеазой S_1 и неспецифической рибонуклеазой *P. brevicompactum* при pH 4,8

мощью ЯМР-спектроскопии и подтверждается устойчивостью к рибонуклеазе *P. brevicompactum*, нуклеазе S_1 *A. oryzae* и корректным соотношением продуктов щелочного гидролиза. В случае гидролиза соединения (VI) получались аденозин-2'(3'), 5'-дифосфат и аденозин, а в случае гидролиза олигонуклеотида (VII) — аденозин-2'(3'), 5'-дифосфат, аденозин-2'(3')-фосфат и аденозин.

Ферментативные методы синтеза олигорибонуклеотидов с применением различных ферментов все шире используются в настоящее время. Особый интерес представляет синтез олигорибонуклеотидов с помощью неспецифических рибонуклеаз, позволяющих синтезировать олигонуклеотиды с любой последовательностью нуклеотидных остатков [14].

В настоящей работе показана принципиальная возможность использования 2'-5'-олигоаденилатов в качестве акцептора в ферментативном синтезе на примере получения аденилил(3'-5')аденилил(2'-5')аденозина (VIII), ранее полученного химическим синтезом [13]. Используя рибонуклеазу *P. brevicompactum* [15], исходя из аденозин-2',3'-циклофосфата и аденилил(2'-5')аденозина (III), было получено соединение (VIII) с выходом 30%. Структура этого соединения была подтверждена его ферментативным гидролизом до аденозин-3'-фосфата и (2'-5')ApA (III) в соотношении 1 : 1.

Ранее в нашей лаборатории были синтезированы ациклические аналоги нуклеотидов и олигонуклеотидов, сохраняющие все функциональные группы природных соединений, но имеющие вместо рибофуранозного цикла полиоксиметиленовую цепочку [16, 17]. В настоящей работе получены родственные аналоги 2'-5'-олигоаденилатов (IX), (X). По методу, описанному в работе [17], окисляли соединения (III) и (IV) периодатом натрия с последующим восстановлением альдегидных групп боргидридом натрия. Продукты реакции выделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NH_4HCO_3 . Выходы соединений (IX) и (X) составляли 48 и 44% соответственно. Структура олигонуклеотидов (IX) и (X) подтверждена ПМР-спектрами, наличие в которых триплетных сигналов 1'-H указывает на присутствие в молекулах 2'- CH_2 -групп.

Известно, что аналогичная модификация в 3'-5'-олигоаденилатах приводит к резкому замедлению скорости гидролиза модифицированных олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда по сравнению с природными [18]. Аналоги 2'-5'-олигоаденилатов (IX) и (X) могут быть интересны для изучения субстратной специфичности 2'-5'-фосфодиэстеразы, так как известно, что модификация 3'-гидроксильной группы в 2'-5'-олигоаденилатах замедляет скорость гидролиза их 2'-5'-фосфодиэстеразой [7].

Экспериментальная часть

Спектры ПМР регистрировали на спектрометре Varian XL-100 (США) с рабочей частотой 100 МГц при 37° С. Для растворов в D₂O измерения выполняли с внутренним стандартом *трет*-бутанолом и пересчитывали относительно тетраметилсилана, принимая химический сдвиг *трет*-бутанола по отношению к последнему равным 1,27 м.д. Величину констант спин-спинового взаимодействия *J* измеряли в герцах. ³¹P-ЯМР-спектры снимали на том же приборе в D₂O, используя 85% Н₃РO₄ в качестве внешнего стандарта, в условиях полного подавления спин-спинового взаимодействия с протонами. Химические сдвиги сигналов, находящихся в более слабом поле по отношению к стандарту, принимали положительными, а в более сильном — отрицательными. В спектрах ПМР приняты следующие обозначения: с — синглет, д — дублет, т — триплет. УФ-спектры регистрировали на приборе Specord UV-VIS (ГДР). Хроматографию в тонком слое проводили на пластинках Silufol UV₂₅₄ (ЧССР) в системе R_f OH — конц. аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (А); на целлюлозе DE-52 (Whatman, Великобритания), сефадексе G-25 (Pharmacia, Швеция).

Полимеризация аденозин-2'(3')-фосфата (I). К смеси 0,7 г (4 ммоль) моно(три-*n*-октил)аммониевой соли аденозин-2'(3')-фосфата в 5 мл сухого диоксиана при перемешивании добавляли 0,33 мл (1,6 ммоль) дифенилхлорфосфата и 0,69 мл (2,9 ммоль) три-*n*-бутиламина, смесь перемешивали 3 ч при 20° С и добавляли 0,33 мл дифенилхлорфосфата и 0,69 мл три-*n*-бутиламина. Через 15 ч при 20° С раствор упаривали, остаток промывали эфиром (5×20 мл), растворяли в воде (30 мл), нейтрализовывали 2,5% NH₄OH до pH 8 и лиофилизировали. Получали 305 мг олигомера (II).

Ферментативный гидролиз олигомера (II) неспецифической рибонуклеазой P. brevicompactum и щелочной фосфатазой E. coli. К раствору 200 мг олигомера (II) в 5 мл воды прибавляли 2 мг рибонуклеазы *P. brevicompactum* (концентрация фермента 10⁻⁵ М) и смесь оставляли на 18 ч при 20° С. К раствору добавляли 0,25 мл 1 М раствора MgCl₂, доводили до pH 8,5 конц. NH₄OH и инкубировали 18 ч при 20° С со щелочной фосфатазой *E. coli* (КФ 3.1.3.1; 10 ед. акт). Смесь пропускали через колонку (2×60 см) с сефадексом G-25. УФ-поглощающие фракции, содержащие 2'-5'-олигоаденилаты, наносили на колонку (6,5×20 см) с DEAE-целлюлозой (НСO₃⁻-форма), колонку промывали водой (1 л) и элюировали NH₄НСO₃ в градиенте концентрации (0,0→0,3 М, общий объем 9 л). Фракции, содержащие продукты, объединяли, упаривали в вакууме досуха, упаривали с водой (5×10 мл) и лиофилизировали.

(2'-5')ArA (III) (аммониевая соль), элюирующая концентрация NH₄НСO₃ 0,05 М, выход 70 мг (34%). *R_f* 0,47 (А). УФ-спектр: λ_{макс}^{pH 7} 260 нм (ε 24 800), λ_{макс}^{pH 1} 258 нм (ε 26 500). ПМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 8,18 с (1H), 8,17 с (1H), 8,01 с (1H) и 7,78 с (1H) (8-H и 2-H), 6,13 д (1H, *J* 5,0), 5,81 д (1H, *J* 3,0) (1'-H).

(2'-5')ArArA (IV) (аммониевая соль) элюировался 0,14 М NH₄НСO₃, выход 15,6 мг (7,5%). *R_f* 0,36 (А). УФ-спектр: λ_{макс}^{pH 7} 260 нм (ε 30 200), λ_{макс}^{pH 1} 258 нм (ε 33 800). ПМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 8,16 с (1H), 8,07 с (1H), 7,97 с (1H), 7,95 с (1H), 7,92 с (1H) и 7,74 с (1H) (8-H и 2-H); 6,04 д (1H, *J* 4,0), 5,91 д (1H, *J* 4,0), 5,81 д (1H, *J* 4,0) (1'-H). ³¹P-ЯМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): -1,31 с, -0,96 с.

(2'-5')ArArArA (V) (аммониевая соль) элюировался 0,21 М NH₄НСO₃, выход 5,6 мг (2,6%). *R_f* 0,30 (А). УФ-спектр: λ_{макс}^{pH 7} 260 нм (ε 39 700), λ_{макс}^{pH 1} 258 нм (ε 45 300). ПМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 8,14 с (1H), 8,06 с (1H), 7,91 с (2H), 7,88 с (2H), 7,81 с (1H) и 7,77 с (1H) (8-H и 2-H), 6,03 д (1H, *J* 4,0), 5,88 д (1H, *J* 4,0), 5,81 д (1H, *J* 4,0), 5,79 д (1H, *J* 4,0) (1'-H).

Ферментативный гидролиз олигомера (II) нуклеазой S₁ A. oryzae и рибонуклеазой P. brevicompactum. К раствору 200 мг олигомера (II) в 10 мл воды прибавляли 200 мкл 3·10⁻⁶ М раствора эндонуклеазы S₁ *A. oryzae* (КФ 3.1.30.1, первоначально КФ 3.1.4.22) в 0,03 М ацетатном буфере (pH 4,7), содержащем 10⁻⁴ М ZnCl₂, и оставляли на 24 ч при

20° С. К раствору добавляли 200 мкл $3 \cdot 10^{-5}$ М раствора рибонуклеазы *P. brevicompactum* в 0,2 М NaCl и выдерживали 18 ч при 20° С. Раствор пропускали через колонку (2×60 см) с сефадексом G-25. УФ-поглощающие фракции, содержащие 2'-5'-олигоаденилаты, наносили на колонку (6,5×20 см) с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻-форма), колонку промывали водой (1 л) и элюировали NH₄HCO₃ в градиенте концентрации (0,0→0,5 М, общий объем 9 л). Фракции, содержащие продукты, объединяли, упаривали в вакууме досуха, упаривали с водой (5×10 мл) и лиофилизировали.

(2'-5')pApA (VI) (аммониевая соль) элюировался 0,17 М NH₄HCO₃, выход 19 мг (16%). *R_f* 0,16 (А). ПМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 8,22 с (1Н), 8,12 с (1Н), 8,01 с (1Н) и 7,96 с (1Н) (8-Н и 2-Н), 6,16 д (1Н, *J* 4,0) и 5,85 д (1Н, *J* 3,0) (1'-Н). ³¹P-ЯМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): +0,3 с, -1,1 с.

(2'-5')pApApA (VII) (аммониевая соль) элюировался 0,20 М NH₄HCO₃, выход 6 мг (4,7%). *R_f* 0,12 (А). ПМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 8,30 с (1Н), 8,21 с (1Н), 7,98 с (3Н) и 7,94 с (1Н) (8-Н и 2-Н), 6,13 д (1Н, *J* 3,5), 5,95 д (1Н, *J* 4,0) и 5,86 д (1Н, *J* 4,0) (1'-Н).

Аденилил(3'-5')аденилил(2'-5')аденозин (VIII). К раствору 10 мг (0,03 ммоль) аденозин-2',3'-циклофосфата и 16 мг (0,025 ммоль) аденилил(2'-5')аденозина (III) в 0,1 мл 0,2 М натрий-фосфатного буфера (рН 7) при 0° С добавляли 2 мкл $2 \cdot 10^{-5}$ М раствора рибонуклеазы *P. brevicompactum* и выдерживали 24 ч при 0° С. Реакцию останавливали добавлением 0,4 мл 5% аммиака, смесь наносили на бумагу Whatman 3ММ и хроматографировали в системе А. УФ-поглощающую зону с *R_f* 0,43 вырезали, продукт элюировали 2,5% аммиаком и лиофилизировали. Выход аммониевой соли соединения (VIII) 7,2 мг (30%). *R_f* 0,35 (А). Спектр ПМР (D₂O, δ, м.д.): 8,35 с (2Н), 8,24 с (1Н), 8,21 с (1Н), 8,15 с (1Н) и 8,09 с (1Н) (8-Н и 2-Н), 6,09 д (1Н, *J* 4,5), 6,03 д (1Н, *J* 4,0) и 5,84 д (1Н, *J* 4,0) (1'-Н).

Аденилил(2'-5')-9-[1',5'-диокси-4'(S)-оксиметил-3'-оксапент-2'(R)-ил]-аденин (IX). К раствору 15,5 мг (0,025 ммоль) аммониевой соли (2'-5')ApA (III) в 0,3 мл воды при охлаждении до 0° С добавляли 6,5 мг (0,03 ммоль) NaIO₄ и оставляли на 16 ч при 0° С. К раствору прибавляли 0,5 мл 0,1 М Ва(ОAc)₂, осадок отфильтровывали, промывали водой (1 мл), к фильтратам добавляли 5,1 мг (0,13 ммоль) NaBH₄ и смесь перемешивали 2 ч при 20° С. К смеси прибавляли 30% уксусную кислоту до рН 7 и раствор наносили на колонку с дауксом 50 (H⁺-форма, объем 2 мл). Колонку промывали водой (5 мл) и продукт элюировали 2,5% аммиаком. Элюат упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 200 мл воды и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻-форма, объем 200 мл), колонку промывали водой (500 мл) и элюировали NH₄HCO₃ в градиенте концентрации (0,0→0,1 М, общий объем 6 л). Соединение (IX) элюировалось 0,05 М NH₄HCO₃. УФ-поглощающие фракции, содержащие продукт, упаривали в вакууме досуха, упаривали с водой (5×10 мл) и лиофилизировали. Выход аммониевой соли соединения (IX) 7,4 мг (48%). *R_f* 0,51 (А). ПМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 8,32 с (1Н), 8,30 с (2Н) и 8,07 с (1Н) (8-Н и 2-Н), 5,09 д (1Н, *J* 5,0) и 4,90 т (1Н, *J* 5,0) (1'-Н).

Этим же методом, исходя из (2'-5')ApApA (IV), синтезировали аденилил(2'-5')аденилил(2'-5')-9-[1',5'-диокси-4'(S)-оксиметил-3'-оксапент-2(R)-ил]-аденин (аммониевая соль), выход 44%. *R_f* 0,40 (А). ПМР-спектр (D₂O, δ, м.д.): 8,24 с (1Н), 8,16 с (2Н), 8,02 с (2Н) и 7,81 с (1Н) (8-Н и 2-Н), 6,14 д (1Н, *J* 4,2), 5,88 т (1Н, *J* 5,1) и 5,83 д (1Н, *J* 3,3) (1'-Н).

Обработка соединений (III)-(X) неспецифической рибонуклеазой *P. brevicompactum*. Раствор соединения (III)-(X) (0,2-0,4 мг) в 0,1 мл трис-ацетатного буфера (рН 5), содержащего 0,1 М NaCl, инкубировали с рибонуклеазой *P. brevicompactum* (конечная концентрация фермента 10^{-6} М) 24 ч при 20° С. Смеси анализировали с помощью ТСХ в системе А. Соединения (III)-(VII), (IX) и (X) полностью устойчивы к данному ферменту. Тринуклеозиддифосфат (VIII) гидролизровался ферментом до аденозин-3'-фосфата и соединения (III) в соотношении 1 : 1,05. Аналогично проводили гидролиз нуклеазой *S.* Соединения (III)-(VII), (IX) и (X) также устойчивы к действию нуклеазы *S.* *A. oryzae*.

Щелочной гидролиз соединений (III)–(X). Раствор соединения (III)–(X) (0,2–0,4 мг) в 0,1 мл 0,3 М NaOH нагревали 16 ч при 37° С. ТСХ в системе А демонстрировала полный гидролиз исходных соединений до аденозина (А) или его окисленно-восстановленного аналога (XI), аденозин-2'(3')-фосфата и аденозин-2'(3'), 5'-дифосфата. Соответствующие зоны хроматограмм элюировались 1% аммиаком и спектрофотометрически определялось соотношение продуктов гидролиза. Приведены шифр исходного соединения, продукты гидролиза и их соотношение: (III), A2'(3')p, А, 1 : 1,06; (IV), A2'(3')p, А, 2 : 0,96; (V), A2'(3')p, А, 3 : 1,01; (VI), p5'A2'(3')p, А, 1 : 0,97; (VII), p5'A2'(3')p, A2'(3')p, А, 1 : 1,02 : 0,97; (VIII), A2'(3')p, А, 2 : 1,02; (IX), A2'(3')p, 9-[4',5'-диокси-4'-оксиметил-3'-оксапент-2'(R)-ил]аденин (XI), 1 : 0,97; (X), A2'(3')p, аналог (XI), 2 : 1,02. Хроматографические подвижности (R_f) в системе А для A2'(3')p, А, p5'A2'(3')p и аналога (XI) составляли 0,2; 0,65; 0,05 и 0,72 соответственно.

Изучение ферментативного гидролиза олигомера (II) методом ^{31}P -ЯМР-спектроскопии.

1. В ампулу для регистрации ЯМР-спектров помещали раствор 15 мг олигомера (II) в 0,5 мл D_2O . ^{31}P -ЯМР-спектр раствора при pH 4,8 представлен на рис. 1.

2. В ампулу помещали раствор 15 мг олигомера (II) в 0,5 мл D_2O и 15 мкл $3 \cdot 10^{-5}$ М раствора рибонуклеазы *P. brevicompactum*. Раствор (pH 4,8) выдерживали 16 ч при 20° С. ^{31}P -ЯМР-спектр приведен на рис. 2.

3. В ампулу опыта 2 добавляли 30 мкл 1 М MgCl_2 , доводили до pH 9 конц. аммиаком, прибавляли 0,1 мл раствора щелочной фосфатазы *E. coli* (10 ед. акт./мл), смесь инкубировали 16 ч при 20° С. ^{31}P -ЯМР-спектр раствора при pH 9 представлен на рис. 3.

4. В ампулу помещали раствор 15 мг олигомера (II), в 0,5 мл D_2O и 15 мкл $3 \cdot 10^{-6}$ М раствора нуклеазы S_1 в 0,02 М AcONa , содержащем 10^{-4} М ZnCl_2 . Раствор (pH 4,8) выдерживали 16 ч при 20° С. ^{31}P -ЯМР-спектр раствора приведен на рис. 4.

5. В ампулу опыта 4 добавляли 15 мкл $3 \cdot 10^{-5}$ М раствора рибонуклеазы *P. brevicompactum*. Раствор (pH 4,8) выдерживали 16 ч при 20° С. ^{31}P -ЯМР-спектр раствора при pH 4,8 приведен на рис. 5.

Авторы благодарят А. Л. Бочарова, В. А. Ежова и Е. Ю. Колбановскую за предоставленные ферменты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kerr I. M., Brown R. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 1, p. 256–260.
2. Williams B. R. G., Kerr I. M. Trends in Biochem. Sci., 1980, v. 5, № 5, p. 138–140.
3. Schmidt A., Zilberstein A., Shulman L., Federman P., Berissi H., Revel M. FEBS Lett., 1978, v. 95, № 2, p. 257–264.
4. Karpeisky M. Ya., Beigelman L., Mikhailov S. N., Padyukova N. Sh., Smrt J. Coll. Czech. Chem. Commun., 1982, v. 47, № 1, p. 156–166.
5. Martin E. M., Birdsall N. J. M., Brown R. E., Kerr I. M. Eur. J. Biochem., 1979, v. 95, № 2, p. 295–307.
6. Revel M., Kimchi A., Schmidt A., Shulman L., Rapoport S., Lapidot Y. In: Regulation of macromolecular synthesis by low molecular weight mediators/Eds Koch G., Richter D. N. Y.: Acad. Press, 1979, p. 341–359.
7. Doetsch P., Wu J. M., Sawada Y., Suhadolnik R. J. Nature, 1981, v. 291, № 5813, p. 355–358.
8. Michelson A. M. J. Chem. Soc., 1959, № 4, p. 1371–1394.
9. Cozzzone P. J., Jardetzky O. Biochemistry, 1976, v. 15, № 22, p. 4853–4859.
10. Сенченко В. Н., Колбановская Е. Ю., Яковлев Г. Н., Карпейский М. Я. Докл. АН СССР, 1980, т. 251, № 3, с. 746–750.
11. Jones S. S., Reese C. B. J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, № 24, p. 7399–7401.
12. Doornbos J., Hartog den J. A. J., Boom van J. H., Allona C. Eur. J. Biochem., 1981, v. 116, № 2, p. 403–412.
13. Charubala R., Uhlman E., Pfeleiderer W. Liebigs Ann. Chem., 1981, № 12, p. 2392–2406.
14. Женодарова С. М. Успехи химии, 1970, т. 39, вып. 8, с. 1479–1493.
15. Хабарова М. П., Женодарова С. М. Ж. орган. химии, 1972, т. 42, вып. 7, с. 4886.
16. Smrt J., Mikhailov S. N., Hynie S., Florentiev V. L. Coll. Czech. Chem. Commun., 1975, v. 40, № 11, p. 3399–3403.

17. Крицын А. М., Михайлов С. Н., Мишарин А. Ю., Падюкова Н. Ш., Флорентьев В. Л. Биоорганич. химия, 1976, т. 2, № 10, с. 1338-1350.
18. RajBhandary V. L. J. Biol. Chem., 1968, v. 243, № 3, p. 556-564.

Поступила в редакцию
11.X.1982

USE OF NUCLEASES FOR SYNTHESIS OF 2'-5' OLIGOADENYLATES AND RELATED COMPOUNDS

KARPEISKY M. Ya., MAMAeva O. K., MIKHAILOV S. N., PADYUKOVA N. Sh.,
YAKOVLEV G. I., SMRT J.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak
Academy of Sciences, Prague

Polyadenylic acid, containing 2'-5' and 3'-5' linkages distributed at random has been prepared by treatment of adenosine 2'(3')phosphate with diphenyl phosphorochloridate. The 3'-5' internucleotidic linkages and the terminal 2',3'-cyclic phosphate groups were removed enzymatically and (2'-5') oligoadenylates ApA, ApApA, ApApApA, pApA and pApApA were isolated. ^{31}P NMR spectroscopy was applied to characterize the synthesized oligomer and the products of its enzymatic hydrolysis. To illustrate the potentiality of enzymic synthesis of oligoisoadenylate analogs with 2'-5' and 3'-5' internucleotide bonds, adenylyl(3'-5')adenylyl(2'-5')adenosine was prepared by condensation of adenosine 2',3'-cyclophosphate with (2'-5')ApA in the presence of nuclease from *Penicillium brevicompactum*. The analogs with modified terminal ribose residue were obtained by periodate oxidation followed by sodium borohydride reduction of (2'-5')ApA and (2'-5')ApApA.